

How protein kinase C potentiates transmitter release from hippocampal mossy fiber terminals.

著者	本田 泉
号	1681
発行年	2000
URL	http://hdl.handle.net/10097/22020

氏 名（本籍） ^{ほん}本 ^だ田 ^{いずみ}泉

学 位 の 種 類 博 士 （ 医 学 ）

学 位 記 番 号 医 博 第 1 6 8 1 号

学位授与年月日 平 成 12 年 3 月 23 日

学位授与の条件 学位規則第 4 条第 1 項該当

研 究 科 専 攻 東北大学大学院医学系研究科
（博士課程）外科学系専攻

学 位 論 文 題 目 How protein kinase C poten-tiates transmitter
release from hippocampal mossy fiber termi-
nals.

（主 査）

論 文 審 査 委 員 教授 橋 本 保 彦 教授 渡 辺 建 彦

教授 糸 山 泰 人

論文内容要旨

【目 的】

海馬 CA3 錐体細胞に形成される苔状線維からの伝達物質放出がジアシルグリセロールのアナログであるフォルボルエステルにより促進されることから、C キナーゼ (PKC) 依存的な増強メカニズムの存在が示唆されている。また、この苔状線維におけるシナプス前性の長期増強 (LTP) の誘導に PKC の活性化が関与しているとする報告がある。PKC の伝達物質放出促進の機構としては、 Ca^{2+} チャンネルの活性化や、 K^{+} チャンネルの抑制、 Ca^{2+} 流入以外の開口放出機構の直接的促進などが考えられているが、詳細は不明であった。そこで、海馬の苔状線維終末においてフォルボルエステルが伝達物質放出を増大させる細胞内メカニズムについて調べた。

【方 法】

実験には 21-28 日齢の BALB/c マウスの海馬スライスを用いた。 Ca^{2+} 感受性色素 fura-2 conjugated dextran を充填したガラスピペットにより軸索を切断することで色素を軸索内に導入し、軸索流によりシナプス前終末に蓄積させる方法を開発し、細胞内 Ca^{2+} 濃度測定に用いた。ピペット刺入部の遠位側に双極刺激電極を置き、0.2ms のパルス幅のトレイン刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇 ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{pre}}$) を二波長励起法で測定した。また、細胞外記録により field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) を測定した。双極刺激電極は歯状回に置き、刺激位置および記録位置は Zaltzky & Nicoll の方法に従った。刺激は paired pulse により行った。 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{pre}}$ 測定および fEPSP 測定の実験の最後に海馬苔状線維に特異的に発現する mGluR2/3 アゴニストである DCG-IV を投与し、その抑制効果から苔状線維の応答であることを確認した。

【結 果】

① 細胞外 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_o$) を 2mM から 1mM に低下させてから phorbol 12, 13-diacetate (PDAc) を投与し、脱分極刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度変動 ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{pre}}$) と fEPSP に対する効果を比較した。fEPSP は 2mM $[\text{Ca}^{2+}]_o$ に比べ、1mM $[\text{Ca}^{2+}]_o$ に PDAc 10 μM を投与すると有意に増大した。一方、 $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{pre}}$ では、2mM $[\text{Ca}^{2+}]_o$ と 1mM $[\text{Ca}^{2+}]_o$ に PDAc を投与したときで有意差が見られなかった。このことから、PDAc による fEPSP の増大の一部は $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{pre}}$ に依存しないことが示された。② PKC の選択的阻害薬 bisindolylmaleimide I (BIS) 10 μM で 1 時間前処理した後に PDAc のと fEPSP に対する効果を比較した。BIS 投与により PDAc による $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{pre}}$ の増大はほぼ完全に抑制された。一方、fEPSP の増大は部分的に

抑制された。このことから、BIS で抑制されない fEPSP の増大は $\Delta [\text{Ca}^{2+}]_{\text{pre}}$ に依存しないことが示された。PDAc による fEPSP の増強は、paired pulse facilitation (PPF) 比の減少を伴っていたが、BIS 抵抗性の増強は PPF 比の減少を伴わなかった。③ PKC- α , PKC- β I/II, PKC- γ に対する阻害作用の高い Gö6976 10 μM で 1 時間前処理後に PDAc の $\Delta [\text{Ca}^{2+}]_{\text{pre}}$ と fEPSP に対する効果を比較した。Gö6976 の投与では、PDAc による $\Delta [\text{Ca}^{2+}]_{\text{pre}}$, fEPSP の増大のいずれも抑制されなかった。

【考 察】

フォルボルエステルによる伝達物質放出の増強は、少なくとも 3 種類の細胞内メカニズムを介して起きていることが示された。すなわち、① $\Delta [\text{Ca}^{2+}]_{\text{pre}}$ の増大に依存する成分。Ca²⁺ チャネルの活性化や K⁺ チャネルの抑制による Ca²⁺ 流入の増大である可能性が高い。② $\Delta [\text{Ca}^{2+}]_{\text{pre}}$ の増大に依存せず、BIS で抑制される成分。シナプス小胞の Ca²⁺ 依存性融合確率の促進が原因であると考えられる。③ $\Delta [\text{Ca}^{2+}]_{\text{pre}}$ の増大に依存せず、BIS で抑制されない成分。シナプス前終末のメカニズムであれば、易放出性小胞プールの増大に帰することができる。

海馬苔状線維終末に発現する PKC サブタイプは α , β I, ε であることが示されているが、Gö6976 で抑制されないことから ①, ② は PKC- ε に関係があると考えられる。また、③ は PKC 以外の C1 ドメインを含む phorbol ester 受容体によるものと考えられる。

審 査 結 果 の 要 旨

海馬 CA3 錐体細胞に形成される苔状線維からの伝達物質放出はフォルボルエステルにより増強される。その機構として、 Ca^{2+} チャンネルの活性化、 K^{+} チャンネルの抑制、 Ca^{2+} 流入以外の開口放出機構の活性化などが考えられているが、詳細は不明である。

本研究では、まず伝達物質放出に重要な役割をはたす細胞内 Ca^{2+} の濃度を測定するために、マウスの海馬苔状線維終末にカルシウム感受性色素 fura-dextran を導入し光学的測定を行う新しい方法を開発した。軸索断端より fura-dextran を導入するという方法は、AM 体を用いる局所還流法よりも導入しうる色素の量が多く、その結果良好な S/N 比を得ることができる。

ついで、フォルボルエステルの一種である phorbol-12, 13-diacetate (PDAc) による、field excitatory postsynaptic potentials (fEPSP) およびトレイン刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇 ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{pre}}$) の増強を測定した。 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{pre}}$ を 2mM から 1mM にすると、fEPSP slope は約 0.5 倍になり、これに 10 μM の PDAc を投与すると約 5 倍に増大した。一方、 $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{pre}}$ は $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{pre}}$ を 2mM から 1mM にすると約 0.6 倍になり、10 μM の PDAc を投与すると $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{pre}} = 2\text{mM}$ の時と同じレベルまでにしか増大しなかったことから、PDAc による fEPSP の増強には $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{pre}}$ の増強を伴う成分と伴わない成分の 2 つがあることが示された。

特異的 C キナーゼ (PKC) 阻害薬である bisindolylmaleimide I (BIS) 10 μM 投与後に PDAc を投与しても、 $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{pre}}$ の有意な増強は見られなかった。一方、fEPSP slope は約 2.7 倍に増大したが、コントロール群に比べて PDAc の効果は減弱した。このことから、PDAc による fEPSP の増強には、 $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{pre}}$ の増大を伴わず BIS で抑制されない成分と BIS で抑制される成分の 2 つがあることが示された。

PKC- ε 以外の conventional PKC を特異的に抑制する Gö6976 10 μM 投与後に PDAc を投与したが、 $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{pre}}$ 及び fEPSP の増強はコントロール群と有意差がなかったことから PDAc の作用は PKC- ε を介するものと考えられた。

本研究では、海馬苔状線維終末内 Ca^{2+} 濃度の測定法を新たに開発するとともに、それを用いてフォルボルエステルが伝達物質放出を増強する機構が ① BIS 感受性で $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{pre}}$ の増大を伴う ② BIS 感受性で $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{pre}}$ の増大を伴わない ③ BIS 非感受性、の少なくとも 3 つあることを証明したものであり、学位授与に値する。